Membranfiltrering – aktuell teknologi som smittebarriere mot Moritella viscosa i lukkede oppdrettssystemer

Av Stine Wiborg Dahle, Trond W. Rosten, Tor Ove Leiknes og Astrid Buran Holan

Stine Wiborg Dahle og *Trond W. Rosten* er forskere ved SINTEF Fiskeri og havbruk AS, og *Tor Ove Leiknes* og *Astrid Buran Holan* er henholdsvis professor og forsker ved NTNU, Institutt for vann- og miljøteknikk.

Summary

"**Membrane filtration – potential technology for establishing infection barrier in closed containment systems**" describes membrane filtration of seawater infected with *Moritella viscosa*, the causative agent of winter ulcer of farmed fish. The project aimed to assess whether membrane filtration can retain *M. viscosa* from infected cold seawater, to evaluate this treatments potential to improve today's technology as a disease controller in land based farming. *M. viscosa* infected seawater (2.1 x 10^6 CFU/ml) was membrane filtered with a membrane from GE Zenon, and the concentration was reduced by 99.99 %, corresponding to a log removal value (LRV) of 3.9 (high level disinfection). *M. viscosa* identified in the cleaned water (MALDI-TOF) is probably contamination, but could also be a result of the membrane performance. This shows that membrane filtration could have a significant potential to improve water treatment systems in hatcheries, closed and semi-closed aquaculture systems, to avoid *M. viscosa* and other pathogenic bacteria. However costs, performance, and operational reliability in large scale production facilities need to be tested along with performance toward fish pathogenic viruses.

Sammendrag

Denne studien beskriver membranfiltrering av sjøvann infisert med bakterien *Moritella viscosa*, som forårsaker sykdommen vintersår hos oppdrettsfisk. Prosjektet tok sikte på å teste ut om membranfiltrering kunne holde tilbake *M. viscosa* fra infisert kaldt sjøvann, og for å se om en slik vannbehandling potensielt kan forbedre dagens teknologi, og fungere som en smittebarriere i lukkede /semi lukkede oppdrettsanlegg. M. viscosa infisert sjøvann (2,1 x 10^6 CFU/ml) ble membranfiltrert med en membran fra GE Zenon. Etter membranfiltrering var bakteriekonsentrasjonen av *M. viscosa* redusert med 99,99 %, tilsvarende en log reduksjonsverdi (LRV) på 3,9, som er meget god desinfiseringsgrad. Ved bruk av MALDI-TOF ble *M. viscosa* identifisert i det rensede vannet og antas å være kontaminering, men det kan ikke utelukkes at det skyldes egenskaper med membranen. Metoden er svært lovende for vannbehandling i settefisk, lukkede og semilukkede anlegg, som en smittebarriere mot M. viscosa og andre sykdomsbakterier hos oppdrettsfisk. Imidlertid må kostnader, prestasjon og driftssikkerhet i storskala systemer, samt ytelse med tanke på fiskepatogene virus utprøves.

Innledning

Bakteriesykdommer har tidvis vært et stort problem i lakseoppdrett. De senere år har det vært flere tilfeller av vintersår hos laks, forårsaket av den gram negative bakterien *Moritella viscosa* (Lunder *et* al., 1995). Tapene i Norge har vært anslått til mer enn 100 millioner kroner årlig (Forskning.no, 2009). Sykdommen forekommer hyppigst i vinterhalvåret når det er lave vanntemperaturer (Lunder *et* al. 1995). Sykdommen kan forårsake stor dødelighet på smolt i sjøvann, men også på laks i sjø, med nedklassing ved slakt som resultat (Forskning.no, 2006). Sykdommen er også observert på marine oppdrettsarter i Norge, som f. eks torsk, kveite og piggvar (Bjorndsdóttir *et* al., 2004; Colquhoun *et* al., 2004; Gudmundsdóttir *et* al., 2006). I tillegg til de økonomiske tapene er vintersår også et velferdsproblem for fisken (Lunder *et* al., 1995; Colquhoun *et* al., 2004), noe som inntil problemet er løst kan begrense bruk av lukkede oppdrettssystemer med sjøvann. Det er noe av et mysterie at bruk av sjøvann skal indusere et bakterielt problem. Kombinasjon av forfiltering og UV har vist seg effektiv som barriere for å hindre inntak av bakterier assosiert med partikler i vannet (Liltved og Cripps 1999), men erfaring fra settefiskanlegg viser at desinfeksjon med UV ikke fungerer tilstrekkelig som en barriere for effektiv beskyttelse mot *Moritella viscosa* selv om lab-forsøk viser at UV effektivt inaktiverer bakterien (Liltved *et* al., 2008). Det finnes ingen god oversikt over hvilke ytelser forfiltrere før UV-filter som er i bruk i akvakulturanlegg har, så man kan vanskelig vurdere betydningen av dette. Når problemer med *Moritella viscosa* på tross av bruk godkjente UV-desinfeksjonssystemer synes å oppstå, kan man stille spørsmål om forfiltereringen, det vil si partikkelfjerningen før UV-bestråling av sjøvann i noen tilfeller er utilstrekkelig. Erfaringer fra andre bransjer der man har slitt med bakterieinfeksjoner peker på at en kombinasjon av ultra-/mikrofiltrering og UV var nødvendig for å oppnå tilfredsstillende desinfisering av drikke- og vaskevann om bord i skip (Ahlen, 2008).

Det er i dag ingen forskriftskrav til desinfeksjon av verken inntaks- eller avløpsvann fra lukkede merdbaserte anlegg i sjø (Rosten *et* al., 2011). Dersom det i et revidert regelverk skulle bli krav om desinfeksjon av inntaksvann til eller avløpsvann fra lukkede anlegg, kan det være naturlig å se på krav i FOR 1997-02-20 nr 192: "Forskrift om desinfeksjon av inntaksvann til og avløpsvann fra akvakulturrelatert virksomhet". Denne forskriften regulerer krav til desinfeksjon blant annet for inntaksvann til settefiskanlegg som har vanninntak med oppgang av anadrom fisk eller bruker sjøvannstilsetting. Kravet for godkjenning er 99,9 % inaktivering av *Aeromonas salmoncida* og ILA-virus. Desinfeksjon ved UV-stråling er den mest aktuelle etablerte teknologien for desinfeksjon av sjøvann og krav til UV-dose satt til 25 mWs/cm^2 (Husby, 2006).

En forlenget smoltfase (såkalt postsmolt) i landbaserte eller semi-lukkede, flytende oppdrettsanlegg er vurdert som et alternativ for å redusere laksens oppholdstid i åpne merder. Bakgrunn for dette er å redusere rømmingsfare, eksponering for lakselus samt andre sykdomsagens. Dette setter store krav til vannbehandling og dagens semilukkede anlegg i sjø har ikke løsninger for desinfeksjon av inntaksvann (Rosten *et* al., 2013). Sårskader er påpekt som en av de store utfordringene ved inntak av sjøvann til produksjon av laksesmolt, postsmolt og laks i lukkede anlegg (Rosten *et* al., 2011). Utprøving av nye metoder innen desinfeksjonsløsninger for sjøvann kan derfor være en vei å gå. Rosten *et* al. (2011 og 2013) har kategorisert lukkede oppdrettssystemer i forhold til grad av lukkethet mot lus, utslipp og smittestoff fra 1 (lavest lukket grad) til 4 (høyest lukket grad). Skal man lykkes med utvikle katergori 4 lukkede oppdrettssystemer med sjøvann kan bruk av kombinasjon av membraner og UV være en mulig løsning.

Membranfiltrering er en fysisk filtreringsprosess der vannet renses uten tilsetting av kjemikalier. Dette er en avansert teknologi for partikkelseparasjon der størrelsen av partiklene som fjernes vil være avhengig av membrantypen anvendt. Membranfiltrering i kategorien mikrofiltrering (0,05–10 µm porestørrelse) og ultrafiltrering (0,002 – 0,05 porestørrelse) brukes bl.a. for å fjerne partikler og mikroorganismer for

produksjon av drikkevann og for rensing av avløpsvann (Van der Bruggen et al., 2003), og i de senere år for rensing av vann i akvakulturanlegg (e.g. Holan et al., 2013a; 2013b; 2013c; 2013d; Wold et al., 2013). Flere studier viser at membranfiltrering er svært effektiv til å fjerne bakterier; opp mot 100 % fjerning ved bruk av ultrafiltreringsmembran (GE Zenon ZW10) med porestørrelse på 40 nm (Osterhus et. al., 2007). Filtreringseffektiviteten og avvisningsmekanismen til en membran bestemmes hovedsakelig av størrelsen på porene. Denne oppgis normalt som nominell verdi, noe som betyr at det vil forekomme både større og mindre porer enn den oppgitte porediameteren. I tillegg vil også andre mekanismer øke avvisninga, som adsorpsjonsprosesser og kakefiltrering (filtrering gjennom et kakelag av celler og andre kolloidale partikler som akkumulerer på membranoverflaten) (Crittenden et al., 2012).

Ifølge Norsk drikkevannsforskrift (FOR 2001-12-04 nr 1372) må en hygienisk barriere kunne vise til minimum 3 $\log_{10}$ reduksjonsverdi (LRV) av bakterier for å være godkjent som hygienisk barriere. Dette tilsvarer en bakterie reduksjon på 99,9 %. Ifølge en rapport (Norwegian Water (Østergaard *et* al., 2009)) er UF-membran godkjent som hygienisk barriere. I veiledningen til drikkevannsforskriften defineres membranfiltrering med nominell poreåpning under 100 nanometer som hygienisk barriere overfor bakterier, dvs. minst 3-log reduksjon (Veiledning til drikkevannsforskriften, versjon 3, Mattilsynet (2011). Membraner har imidlertid i liten grad blitt benyttet til å stanse fiskepatogene bakterier, og vår tilnærming var å undersøke dette nærmere og bestemme tilhørende LRV-verdi. Ifølge Forskriften for desinfeksjon av inntaksvann og avløpsvann fra akvakulturrelatert virksomhet (FOR-1997-02-20-192), skal en hygienisk barriere til eksempel fylle kravet om 3 LRV for bakterien *Aeromonas salmonicida*.

Prosjektet tok sikte på å teste ut en hypotese om at membranfiltrering av kaldt sjøvann infisert med en høy konsentrasjon av *M. viscosa* ville holde tilbake *M. viscosa,* og at det rensede vannet (permeatet) vil ha en betydelig redusert konsentrasjon av bakterien. Resultatet ville gi en indikasjon på om denne formen for vannbehandling kan brukes i utvikling av teknologi for vanndesinfeksjon for settefiskanlegg med sjøvannsinntak eller vanndesinfeksjon i semi-lukkede anlegg. Det ble tatt sikte på å utfordre membranen ved å bruke tilsats av en høy konsentrasjon av *M. viscosa* (jfr smittemodeller, Wallace *et* al. 2003; Løvoll *et* al. 2009) og å analysere sjøvannet før og etter filtrering ved bruk av avansert artsidentifikasjon for bakterier (MALDI-TOF) med tanke på tilstedeværelse av *M. viscosa*. Bakteriekulturen ble innhentet i samarbeid med Veterinærinstituttet.

Materialer og metoder

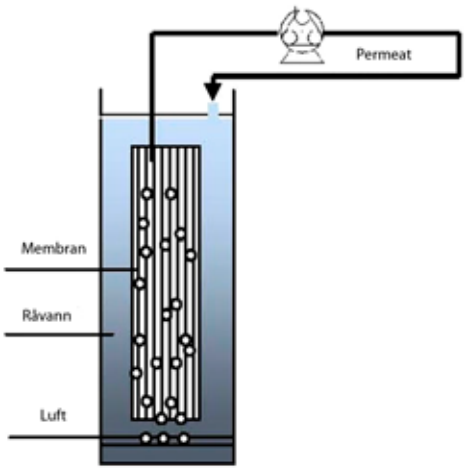
Oppdyrking av *Moritella Viscosa*

Oppdyrking av *Moritella Viscosa* ble utført ved mikrobiologisk laboratorium hos SINTEF Fiskeri og havbruk, hvor alt utstyr var sterilt, inkludert laboratoriebenk med avtrekk. Bakteriestamme av *M. viscosa* fra laks (*Salmo salar*) (isolatnummer 2033) ble hentet inn fra Veterinærinstituttet og dyrket opp i 50 ml flytende medium (Tryptic Soy Broth, TSB, Merch), tilsatt natruimklorid (NaCl) til en sluttkonsentrasjon på 2 %, i to døgn ved 15 °C og 200 rpm (rotasjoner pr minutt) (Benediktsdóttir & Heidarsdóttir, 2007). Vekst ble målt daglig ved bruk av absorbans (590 nm) og plateleser (EPOCH, Bergman). Konsentrasjon ble bestemt ved utplating av ulike fortynninger på 100 µl på Tryptic Soy Agar (TSA, Merch) med 2 % NaCl. Agar ble inkubert ved 15 °C i to døgn før CFU/ml ble beregnet ved de ulike verdiene for absorbans. Bakteriene ble tatt ut i log-fase og fryst ned i ampuller på 1 ml med 20 % glyserol ($C_3H_5(OH)_3$) ved -80 °C, for å benyttes til membranfiltreringsforsøket. Fryste stammer ble tint og tilsatt 50 ml TSB og dyrket i to døgn under betingelsene gitt ovenfor. Bakterievekst ble målt med plateleser og CFU/ml beregnet når bakteriene var i log-fase. Bakteriesuspensjonen ble så tilsatt til autoklavert sjøvann for membranfiltrering i en beregnet konsentrasjon på 1.0 x 10^7 CFU/ml. Denne konsentrasjonen er basert på studier av Wallace *et* al. (2003) og Løvoll *et* al. (2009) som

benyttet en konsentrasjon mellom 2.0 x 10^5 og 1.0 x 10^6 CFU/ml for å infisere laks ved badsmitte. Ifølge Meyn *et* al. (2012) vil en del av mikroorganismene kunne feste seg til karveggene og andre overflater, og man bør derfor benytte en høyere konsentrasjon for å oppnå en tilstrekkelig konsentrasjon i vannet.

Membranfiltrering

Membranfiltrering ble utført på "Marin laboratorium" hos SINTEF Fiskeri og havbruk og NTNU, og i motsetning til "Mikrobiologisk lab" var dette laboratoriet ikke sterilt. Membranen ZeeWeed 10 fra GE Zenon (nominell porestørrelse 40 nm, overflateareal 0,93 m^2) og membrantanken ble grundig rengjort ved å følge anbefalt prosedyre fra leverandøren som består av vasking med hypokloritt - og sitronsyreløsninger før forsøkene. Til membrantanken på 8 L ble autoklavert sjøvann (10.7 °C, pH 7.97, salinitet 34 ‰) og *M. viscosa* tilsatt til en beregnet konsentrasjon på 1.0 x 10^7 CFU/mL ($C_{råvann}$). Luftbobling inne i membrantanken sørget for god, kontinuerlig omrøring (Figur 1). Membranen ble umiddelbart satt i gang med en konstant gjennomstrømming på 36 L/m^2/h ved gitt temperatur. Vannet drives gjennom porene ved hjelp av en peristaltisk pumpe som genererer vakuum inne i de hule membranene. På denne måten filtreres råvannet gjennom membranporene og det produseres renset vann (permeat), figur 1. Råvannet i membrantanken ble membranfiltrert i en time, og i dette oppsettet ble det rene, filtrerte vannet (permeatet) tilbakeført membrantanken. På denne måten ble råvannet i membranfiltrert 4 ganger, og den samme konsentrasjonen av bakterier i membrantanken ble bevart gjennom hele forsøket. Gjennom artsidentifisering kunne man påvise om de bakteriene som gikk igjennom membranen virkelig var *Moritella viscosa.*



Figur 1. Skisse av membranen benyttet i forsøkene, ZeeWeed 10-membran. Den peristaltiske pumpen genererer vakuum inne i de hule membranene. Dette er drivkraften som fører til at råvannet filtreres gjennom membranporene og det produseres renset vann (permeat). I dette oppsettet tilbakeføres permeatet til membrantanken.

Vannprøver for bestemmelse av bakteriekonsentrasjon og LRV

Prøver fra permeatet (membranrenset vann) ble overført aseptisk til sterile glassflasker og deretter transportert til steril laboratorium for mikrobiologisk undersøkelse. For å finne eventuell tilstedeværelse og konsentrasjon av *M. viscosa* ble tre vannprøver fra hvert prøveuttak platet ut på agar (TSA) i ulike fortynninger i triplikater. Ettersom bakterier kan adsorbere til alle overflater (Meyn *et* al., 2012) ble nøyaktig bakteriekonsentrasjonen i membrantanken (råvannet) ($C_{råvann}$) målt 2 min etter tilsetting av bakterier/oppstart membranfiltrering. Dette ble gjort for å unngå overestimering av bakteriefjerning (fjerning som ikke skyldes membranfiltreringa, men som skyldes adsorpsjon til alle typer overflater). Bakteriereduksjonen etter membranfiltrering beregnes som log reduksjonsverdi (LRV) ved hjelp av ligning 1, der C er antall kolonidannede enheter per ml (CFU/ml), $C_{råvann}$ er bakteriekonsentrasjonen målt 2 min etter tilsetting og $C_{permeat}$ er bakteriekonsentrasjonen målt etter membranfiltrering.

$$\text{Log reduksjonsverdi (LRV)} = \log \frac{C_{råvann}}{C_{permeat}} \qquad (1)$$

Artsidentifisering

Bakteriestamme av *M. viscosa* fra Veterinærinstituttet (stamme 2033) og bakteriekolonier som

Skår	Beskrivelse
2.300…3.000	Høy sannsynlig artsidentifikasjon
2.000…2.299	Sikker slektsidentifikasjon, sannsynlig artsidentifikasjon
1.700…1.999	Mulig slektsidentifikasjon
0.000…1.699	Ikke pålitelig identifikasjon

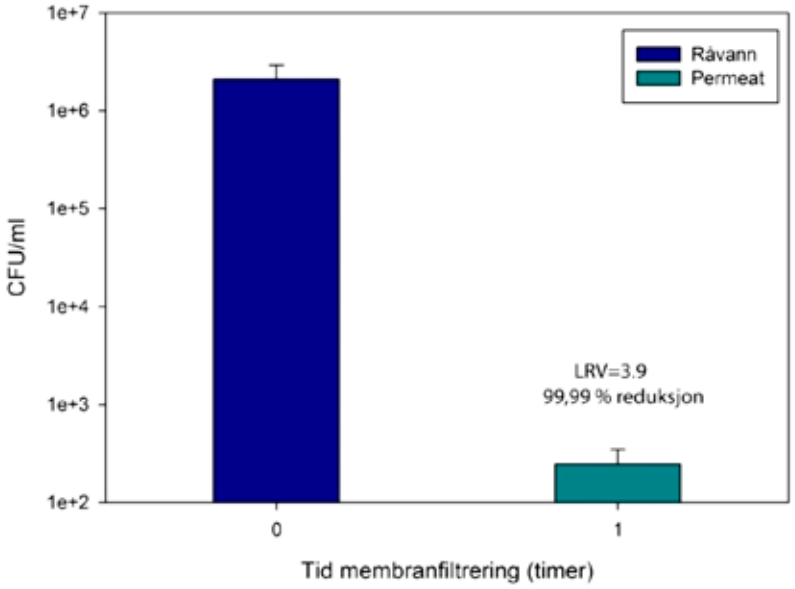
Tabell 1. Skår og beskrivelse av resultater fra MALDI-TOF.

vokste opp på agar etter membranfiltrering ble inkubert i to dager på agar (TSA) ved 15 °C. Enkeltkolonier ble av SINTEF Materialer og kjemi applisert på målplate og tilsatt α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA). Koloniene ble deretter identifisert til art ved hjelp av instrumentet MALDI-TOF (UltraFlex – TOF/ TOF, Bruker Daltonics, Bremen, ved NTNU, DMF, Promec) tilknyttet et databasesystem (software Biotyper RTC og Biotyper 3.0) (SINTEF Materialer og kjemi). Dette er en ny metode for artsidentifisering som er svært treffsikker og tidsbesparende. Prøvene ioniseres skånsomt med laser før de separeres etter «time-of-flight» og identifiseres ved hjelp av massespektrometri. Resultatene blir sammenlignet med et bibliotek med kjente bakterier og i løpet av kort tid vil det genereres en liste med best samsvarende treff, tabell 1. Som oftest blir den identifikasjonen som har høyest skår gitt som svar. Bakteriestammen fra Veterinærinstituttet ble benyttet som referansestamme for *M. viscosa*.

Resultater og diskusjon

M. viscosa ble tilsatt til råvannet i en beregnet konsentrasjon på 1.0 x 10^7. Konsentrasjonen av bakterien i råvannet 2 minutter etter start ($C_{råvann}$) ble målt til 2.1 x 10^6 CFU/mL. Reduksjonen i råvannet skyldes mikroorganismenes evne til å feste seg til karvegger og andre overflater (Meyn *et* al., 2012), og skal ikke tas med i beregning av LRV. Vannprøven tatt fra permeatet etter 1 time med membranfiltrering hadde en konsentrasjon ($C_{permeat}$) på 2.5 x 10^2 CFU/mL. Ifølge ligning 1 er dette en log reduksjonsverdi (LRV) på 3.9, som tilsvarer en bakteriereduksjon på 99.99 %, figur 2.

Bakteriekoloniene som vokste opp på agar fra permeat etter membranfiltrering ble analysert



Figur 2. Konsentrasjon av bakterier (CFU/ml) i råvannet ved start og i permeatet etter 1 time membranfiltrering med GE Zenon ZeeWeed 10 membran. Y-akse vist i log-skala og starter på 1 x 10^2. n= 3.

ved hjelp av MALDI-TOF (n=5) og fikk en skår mot referansestammen av *M. Viscosa* mellom 2.502 og 2.604. Høy sannsynlig artsidentifikasjon gir en skår mellom 2.300 til 3.000, tabell 1. Dette viser at bakteriene virkelig var *M. viscosa,* stamme 2033 som var identisk med de som ble tilsatt til membrantanken.

M. viscosa som ble identifisert på agar etter filtrering antas å være kontaminering fra dråper i lufta og/eller fra permeatslangen, da forsøksoppsettet gjør det vanskelig å jobbe helt sterilt, figur 1. Da *M. viscosa* (ca. 1000-2000 nm, Benediktsdóttir, E., pers. komm) er større enn nominell poreåpningen i membranen (40 nm) kunne man anta at alle bakterier fjernes, men de er også stavformede og fleksible, dermed kan man stille spørsmål om enkelte bakterier likevel vil kunne slippe gjennom membranen siden den oppgitte porestørrelsen er en nominell verdi. Filtreringseffektiviteten vil sannsynligvis avhenge noe av type membran, systemkonfigurasjon og driftsparametere, men dette må undersøkes nærmere. Under membranfiltreringen ble det oppnådd en LRV på 3,9, noe som tilsvarer en bakteriereduksjon på 99,99 %. Dette fyller rensekravet til hygienisk barrierer i drikkevannsrensing (3 LRV for bakterier) og kravet til desinfeksjon av inntaksvann til akvakulturrelatert virksomhet (3 LRV for bakterien *Aeromonas salmonicida*). Virusrelaterte sykdommer infeksiøs pancreas necrose (IPN) og infeksiøs lakseanemi (ILA), pancreas disease (PD) representer fortsatt alvorlige sykdomsproblemer i akvakulturnæringen (Bornø et al,. 2010). Hvordan membranteknologien fungerer alene med tanke på desinfeksjon mot disse fiskepatogener er uklart, men kombinasjon med UV med tilpassede kjente doser (100-250 mWs/cm^2 for 99,9 % IPN-reduksjon (Husby, 2006)), kan kanskje være en løsning.

Resultatene av dette relativt enkle forsøket peker i retning av at membranfiltrering er en lovende teknologi for å hindre inntak av bakterier som forårsaker vintersår hos laks i settefiskanlegg med sjøvannsinntak og i semi-lukkede anlegg i sjø. Dette kan bidra til å redusere forekomst av vintersår og ha positiv velferdseffekt, samt redusere dødelighet. I tillegg er metoden i teorien lovende som vannbehandling for å hindre andre sykdomsbakterier som er et problem i produksjon av laks, f. eks. *Flavobacterium psychrophilum, Yersinia Ruckeri* (Yersiniose) og *Renibacterium salmoninarum* (bakteriell nyresyke (BKD)) (Johansen, 2013) som er et problem i settefisk, men også i oppdrett av andre arter, som f. eks berggylt, rognkjeks og kveite. Hvordan membranfiltrering fungerer for reduksjon av fiskepatogene virus i vann er mer uklart.

Nye undersøkelser vil måtte se på effekter både innen mikrobiologi og fiskehelse når en membran installeres som en filtreringsenhet i inntaksvannet til akvakulturanlegget, alene eller i kombinasjon med annen desinfisering, eller som en del av vannbehandlingen i et resirkuleringsanlegg. Siden membranfiltrering er en ny teknologi i akvakultur, er det nødvendig å designe og konfigurere membranteknologi for bruk i kommersielle anlegg. Hvorvidt membranfiltrering er egnet og vil bli tatt i bruk som hygienisk barriere i oppdrett vil etter vår vurdering, avgjøres av kostnader ved investering og bruk av metoden, samt driftserfaringer i kommersiell produksjon. Valg av prosessteknologi er viktig for integrering av ny vannbehandling i akvakultur. Det finnes mange membranleverandører verden over og flere membrantyper bør testes ut for anvendelse på akvakulturformål. Effekt av filtrering gjennom en membran bør dokumenteres i både lab- og fullskala. Det anbefales at det også gjennomføres forsøk med mikrofiltrering (MF) som har en høyere vanngjennomstrømning (større poreåpning), gjerne i kombinasjon med UV eller ozon (multiple barriers) for å oppnå ønskede hygieniske forhold. For å dokumentere membranfiltrering som en holdbar og pålitelig vannbehandling over tid anbefales konsistenskontroll (holdbarhetskontroll) for å avdekke imperfeksjoner i konstruksjonen eller i system oppsettet. Selv om en membran har en levetid på flere år vil membranen degraderes over tid. Uansett resultatene fra vår studie indikerer positiv effekt på evnen til å desinfisere, men ikke sterilisere infisert sjøvann for *Moritella viscosa.*

Anerkjennelse til bidragsytere

Prosjektet er finansiert av Fiskeri- og havbruksnæringens forskingsfond (FHF). Bakteriestammen av *M. viscosa* ble hentet inn i samarbeid med Eirik Biering og Duncan Colquhoun ved Veterinærinstituttet. Artsidentifisering av *M. viscosa* ble gjort i samarbeid med Marianne Aas og Catrine Ahlen ved SINTEF Materialer og kjemi. Vi takker også Per-Arvid Wold (NTNU, Institutt for biologi/Institutt for vann- og miljøteknikk) og Jorunn Skjermo (SINTEF Fiskeri og havbruk AS) for bistand med forsøksoppsett og kvalitetssikring.

Referanser

Ahlen, C.,E., (2008). Infections from water. Presentation on Solstad rederikonferanse, Skudeneshavn. SINTEF S9423.

Benediktsdóttir, E. & Heidarsdóttir, K. J. (2007). Growth and lysis of the fish pathogen *Moritella viscosa*. Letters in Applied Microbiology, 45: 115-120.

Bjornsdóttir, B., Gudmundsdóttir, Bambir, S. H., Magnadóttir, B., Gudmundsdóttir, B. K. (2004). Experimental infection of turbot, *Scopthalmus maximus* (L.), by *Moritella viscosa*, vaccination effort and vaccine-induced side-effects. Journal of Fish Diseases, 27: 645-655.

Bornø, G., Sviland, C. (eds) Fiskehelserapporten 2010. Veterinærinstituttet. ss35.

Colquhoun, D. J., Hovland, H., Hellberg, H., Haug, T., Nilsen, H. (2004). *Moritella viscosa* isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua*). Bull Eur Ass Fish Pathol, 24:109-114.

Crittenden, J. C., Trussell, R. R., Hand, D. W., Howe, K. J., Tchobanoglous, G. (2012). Water treatment principles and design. Hoboken, New Jersey, John Wiley & Sons, Inc.

FOR-1997-02-20-19 Forskrift for desinfeksjon av inntaksvann og avløpsvann fra akvakulturrelatert aktivitet.

FOR 2001-12-04 nr 1372: Forskrift om vannforsyning og drikkevann – Drikkevannsforskriften.

Forskning.no (2006). Vintersår nå også hos settefisk. http://www.forskning.no/artikler/2006/oktober/1159863321.86

Forskning.no (2009). Miljøpåvirket vintersår bakterie. http://www.forskning.no/artikler/2009/september/228303

Gudmundsdóttir, B. K., Björnsdóttir, B., Gundmundsdóttir, S., Bambir, S. H. (2006). A comparative study of susceptibility and induced pathology of cod, *Gadus morhua* (L), and halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), following experimental infection with *Moritella viscosa*. J Fish Dis, 29: 481-487.

Holan, A. B., Wold, P.-A., Leiknes, T. O. (Submitted 2013a). Assessment of a biofilm reactor coupled with membrane filtration for increased ammonia conversion, and reduced particle and nitrogen concentration in marine recirculating aquaculture systems (RAS).

Holan, A. B., Wold, P. A., Leiknes, T. O. (2013b). Membrane performance and fouling behaviour in marine recirculating aquaculture systems. Aquacultural Engineering. DOI 10.1016/j.aquaeng.2013.10.002

Holan, A. B., Wold, P. A., Leiknes, T. O. (2013c). Integrated Membrane Bioreactor for Water Quality Control in Marine Recirculating Aquaculture Systems. Separation Science and Technology, 48 (12): 1758-1767.

Holan, A. B., Wold, P. A., Leiknes, T. O. (2013d). Intensive rearing of cod larvae (*Gadus morhua*) in recirculating aquaculture systems (RAS) implementing a membrane bioreactor (MBR) for enhanced colloidal particle and fine suspended solids removal. Aquacultural Engineering, DOI 10.1016/j.aquaeng.2013.10.001.

Husby, A. (2006). Bruk av UV-lys for desinfeksjon av vann i oppdrettsnæringen. Norsk fiskeoppdrett nr 2 2006.

Johansen, R. (2013). Fiskehelserapporten, 2012. Veterinærinstituttet, Oslo, 45 pp.

Liltved H. and Cripps S. 1999. Removal of particle-associated bacteria by prefiltration and ultraviolet irradiation. *Aquaculture Research*. 30, 445-450.

Liltved H., Bomo A.M., Handeland S.O. and Kristensen T. 2008. UV inactivation of *Moritella viscosa* and other fish pathogens - inactivation, photoreactivation and by-product formation. Proceedings Seventh International Conference on Recirculating Aquaculture, July 25 – 27, 2008, Roanoke, VA, USA.

Lunder, T., Evensen, Ø., Holstad, G., Håstein, T. (1995). Winter ulcer in the Atlantic salmon *Salmo salar*. Pathological and bacteriological investigations and transmission experiments. Diseases of Aquatic Organisms, 23: 39-49.

Løvoll, M., Wiik-Nielsen, C. R., Tunsjø, H. S., Colquhoun, D., Lunder, T., Sørum, H., Grove, S. (2009). Atlantic salmon bath challenged with Moritella viscosa – Pathogen invasion and host response. Fish & Shellfish Immunology, 26 (6): 877-884.

Meyn, T., Leiknes, T. O., A. Konig (2012). MS2 removal from high NOM content surface water by coagulation - ceramic microfiltration, for potable water production. Aiche Journal, 58 (7): 2270-2281.

Osterhus, S., Azrague, K., Leiknes, T. O., Odegaard, H. (2007). Membrane filtration for particles removal after ozonation-biofiltration.Water Science and Technology, 56 (10): 101-108.

Rosten, T., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Terjesen, B. F., Biering, E., Winter, U., (2011). Oppdrett av laks og ørret i lukkede anlegg - forprosjekt (rapport A-21169). Trondheim: SINTEF Fiskeri og havbruk.

Rosten, T., Terjesen, B. F., Ulgenes, Y., Henriksen, K., Biering, E., Winter, U. (2013). Lukkede oppdrettsanlegg i sjø–økt kunnskap er nødvendig. VANN 01 2013. p 5-13.

Van der Bruggen, B., Vandecasteele, C., Van Gestel, T., Doyen, W., Leysen, R. (2003). A review of pressure-driven membrane processes in wastewater treatment and drinking water production. Environmental Progress, 22 (1): 46-56.

Wallace, C., Maria, C., Syvertsen, C., Thoen, E., Midtlyng, P. J. (2003). Vaccine performance testing with *Moritella viscosa* using different challenge models. Poster presented at 3rd International Symposium on Fish Vaccinology, Bergen 2003.

Wold, P. A., Holan, A. B., Øie, G., Attramadal, K., Bakke, I., Vadstein, O., Leiknes, T. O. (2013). Effects of membrane filtration on bacterial number and microbial diversity in marine recirculating aquaculture systems (RAS), Aquaculture DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.11.019

Østergaard, H, Østerhus, S. and Melin, E. (2009). Norwegian Waters BA. Rapport on optimal disinfection practice, nr. 169.